

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
10 avril 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/028692 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : A61K 7/48

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/03344

(22) Date de dépôt international : 1 octobre 2002 (01.10.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/12802 3 octobre 2001 (03.10.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SE-  
DERMA [FR/FR]; 29 rue du Chemin Vert - BP 33,  
F-78612 Le Perray-en-Yvelines Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : LINTNER,  
Karl [FR/FR]; 69 rue de l'Assomption, F-75016 Paris  
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: COSMETIC AND DERMOPHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR SKIN PRONE TO ACNE

(54) Titre : COMPOSITIONS COSMETIQUES ET DERMOPHARMACEUTIQUES POUR LES PEAUX A TENDANCE AC-  
NEIQUE

(57) Abstract: The invention relates to the use of an extract of olive leaves (*Olea europaea*) which is titrated in oleanolic acid and  
which may or may not be associated with a *Larrea divaricata* extract which is titrated in nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Said  
products are intended for all types of cosmetic and dermopharmaceutical compositions for all forms of skin care, for moisturising  
and anti-inflammatory purposes and, in particular, for the prevention and treatment of skin prone to acne.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'un extrait de feuilles d'olivier (*Olea europaea*) titré en acide oléanolique, associé  
ou non à un extrait de *Larrea divaricata* titré en acide nordihydroguaiarétique (NDGA). Ces produits sont destinés à toutes formes  
des compositions cosmétiques et dermopharmaceutiques pour tous les soins de la peau, à visée hydratante, anti-inflammatoire et  
particulièrement dans la prévention et le traitement des peaux à tendance acnéique.

WO 03/028692 A2

**TITRE** Compositions cosmétiques et dermopharmaceutiques pour les peaux à tendance acnéique.

Il existe différentes formes d'acné :

- 5    ➤ Juvénile, qui peut apparaître vers l'âge de 9 ans, sans signe annonciateur de puberté, et qui touche, peu ou prou, environ 70 % des adolescents des deux sexes,
- De l'adulte qui, hormis les conséquences d'un traitement hormonal contraceptif, correspond en fait, dans la plupart des cas, à une acné juvénile persistante à la suite d'absence de traitement ou de traitement inapproprié,
- 10   ➤ Médicamenteuse, dont les principaux responsables sont la vitamine B12, les corticoïdes généraux ou locaux, les préparations à base d'iode ou de brome, les androgènes et les pilules ou progestatifs à tendance androgénique,
- Néonatale, qui est due aux hormones androgènes maternelles et qui guérit spontanément,
- 15   ➤ Excoriée des jeunes filles, qui correspond à l'aggravation de l'acné juvénile normale et classique à cause d'une manipulation quasi obsessionnelle des boutons d'acné.

Ainsi, la plupart des acnés dérivent plus ou moins directement de l'acné juvénile.

L'acné est vraisemblablement une pathologie multifactorielle qui peut se résumer par le triptyque suivant : hyperséborrhée + trouble de la kératinisation du canal pilo-sébacé +  
20   un facteur microbien.

### ***Hyperséborrhée***

Il n'y a pas d'acné sans hyperséborrhée et, grossièrement, l'acné est proportionnelle à l'importance de la séborrhée. La sécrétion de sébum est sous contrôle hormonal, elle constitue même un des meilleurs indices d'imprégnation androgénique, ce qui explique  
25   l'apparition de l'acné au moment de la puberté qui correspond à une *explosion* hormonale physiologique.

L'hormone androgénique la plus impliquée dans l'acné est la testostérone.

La testostérone gonadique circule dans l'organisme sous forme liée à une protéine et seule la testostérone libre pénètre dans le cytoplasme de la cellule cible : la glande  
30   sébacée. Là, une enzyme, la 5 $\alpha$ -réductase, transforme la testostérone en son métabolite

actif, la DHT (dihydrotestostérone) qui va stimuler la synthèse des nucléoprotéines. Plus il y a de DHT qui arrive au noyau, et plus les cellules de la glandes sébacées augmentent de taille, se multiplient, se chargent en lipides et, comme il s'agit d'une glande à sécrétion holocrine, plus la quantité de sébum excrété sera importante.

#### 5 ***Trouble de la kératinisation du canal pilo-sébacé***

Ce point constitue une condition *sine qua non* de la survenue de l'acné.

L'épithélium qui borde le canal pilo-sébacé au niveau de l'infra-infundibulum, forme alors une grande quantité de cellules kératinisées anormales, une grande quantité de kératine ainsi qu'un ciment intercellulaire particulièrement peu soluble. Il se crée au  
10 niveau de l'infra-infundibulum un bouchon corné compact qui empêche l'expulsion du sébum: c'est le stade de microkyste ou comédon fermé, véritable lésion élémentaire de l'acné.

Ce microkyste va alors pouvoir évoluer de deux façons :

- Soit la kératine et le sébum continuent à gonfler le microkyste et obligent l'acro-  
15 infundibulum à se dilater. C'est le comédon ouvert ou banal point noir sans gravité réelle,
- Soit il y a rupture de la paroi du microkyste avec irruption dans le derme de sébum, de kératine, d'acides gras libres. Il se forme alors une réaction inflammatoire qui va être aggravée par la dernière composante des causes de l'apparition de l'acné

#### 20 ***Facteur microbien***

Il existe à l'état normal dans le follicule pilo-sébacé 3 types de micro-organismes :

- Une levure : *pityrosporum ovale* dont le rôle pathogène dans l'acné apparaît nul,
- Un staphylocoque blanc non pathogène,
- Une bactérie anaérobie, diphtéroïde, Gram + : *corynébactérium acnes* (encore  
25 appelé *propionibactérium acnes*) qui synthétise une lipase capable d'hydrolyser les triglycérides du sébum en acides gras libres irritants pour le derme. Ce germe intervient également dans la production locale de protéase, hyaluronidase et neuraminidase qui vont aggraver la situation inflammatoire évoquée au point précédent.

Les données présentées ci-dessus correspondent à un florilège des documents suivants:

F. Poli (1996) Acné prépubertaire, Le Concours Médical, 118:905-908 ; P. Morel (1981) polycopié de dermato et vénéro, Le Kremlin Bicêtre : 161-179 ; François DANIEL (1977) Dermatologie pratique, Edition Dupuy-Compton Médical, Neuilly.

5 Aussi bien au cours de l'adolescence qu'à l'âge adulte, l'acné provoque chez les personnes qui ont une peau à tendance acnéique, une image de soi négative.

L'industrie Cosmétique est donc dans son rôle lorsqu'elle propose une nouvelle approche pour résoudre les problèmes des peaux à tendance acnéique.

L'objet de ce brevet est la découverte que l'acide oléanolique ainsi que les extraits  
10 de la feuille d'olivier (*Olea europaea*) titrés en acide oléanolique possèdent une forte activité inhibitrice de l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase et peuvent constituer ainsi un élément important dans la lutte contre les symptômes de la peau acnéique. Il a également été découvert que l'acide oléanolique et les extraits de la feuille d'olivier possèdent une activité antimicrobienne contre *Propionebactérium acnes* et  
15 *Acinetobacter calcoaceticus*. L'utilisation de l'acide oléanolique et des extraits de feuille d'olivier pour prévenir et traiter les symptômes de la peau acnéique et à tendance acnéique est donc nouvelle.

De plus, de manière surprenante, il a été découvert qu'une synergie peut être obtenue en associant l'acide nordihydroguaiarétique ou un extrait de *Larrea*  
20 *divaricata* titré en acide nordihydroguaiarétique avec l'acide oléanolique ou les extraits de feuille d'olivier.

En effet, l'acide nordihydroguaiarétique est un inhibiteur du métabolisme des protéines dans l'appareil de Golgi et joue ainsi un rôle de modérateur de la croissance cellulaire. L'emploi de l'acide nordihydroguaiarétique pour ralentir la  
25 croissance des fanères a été décrite dans FR 2785804. Il s'avère que l'association acide oléanolique et acide nordihydroguaiarétique ou des extraits les contenant renforce l'activité antimicrobienne et diminue l'hyperkératinisation en même temps, ce qui permet de mieux prévenir les symptômes de l'acné.

L'activité anti-acné peut encore être renforcé si l'on formule les compositions  
30 cosmétiques et dermopharmaceutiques contenant les extraits cités, en ajoutant

d'autres composés appropriés, tels que les actifs hydratants et/ou osmotiques, séborégulateurs, kératolytiques, spécifiquement antimicrobiens et antiinflammatoires.

Les autres constituants des compositions peuvent correspondre à tout ingrédient  
5 habituellement ou nouvellement utilisé ou utilisable en Cosmétique ou en Dermopharmacie.

Les exemples 1 à 4 illustrent différentes possibilités de compositions destinées à des utilisations cosmétiques ou dermatopharmaceutiques contenant l'acide oléanolique et/ou l'acide nordihydroguaiarétique ou les extraits correspondants.  
10 Les exemples 5 à 10 illustrent les effets de ces compositions ainsi que les synergies d'effets constatés avec l'association de différents composants.

**Exemple 1 : Mélange concentré (prémix) pour la préparation de produits cosmétiques à visée anti-acné**

15	Butylène Glycol	25 ,00
	Acide oléanolique	0,03
	Acide nordihydroguaiarétique	0,04
	PEG-60 Almond glycerides	10,00
	Osmocide® (Sederma)	64,93

20

**Exemple 2 : Gel nettoyant et hydratant pour peaux à tendance acnéiques**

	Carbopol <sup>R</sup> 1342 (Goodrich)	0,3
	Propylène glycol	2
	Glycérine	1
25	Vaseline blanche	1,5
	Cylomethicone	6
	Alcool cétylique	0,5
	Lubrajel <sup>®</sup> MS (United Guardian)	10
	Triéthanolamine	0,3
30	Acide oléanolique	0,0015

acide nordihydroguaiarétique	0,002
Osmocide <sup>®</sup> (Sederma)	9,0
Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g

5 **Exemple 3: Crème de soin pour peaux grasses**

Brij <sup>R</sup> 721 (ICI)	2,4
Volpo <sup>R</sup> S72 (Croda)	2,6
Prostéaryl-15 (Croda)	8,0
Cire d'abeille	0,5
10 Abil <sup>R</sup> ZP 2434 (Goldschmidt)	3,0
Propylène glycol	3,0
Carbopol <sup>®</sup> 941 (B.F. Goodrich)	0,25
Triéthanolamine	0,25
Extrait d' <i>Olea europaea</i>	10,0
15 Extrait de <i>Larrea divaricata</i>	5,0
Osmocide <sup>®</sup> (Sederma)	10,0
Eau, conservateurs, parfums	qsp 100 g

**Exemple 4 : Lotion nettoyante**

20 Ethanol	1.0
Propylène glycol	2.0
Abil <sup>R</sup> B8851 (Goldschmidt)	0.5
Eumulgin <sup>®</sup> L (Henkel)	0.6
Acide oléanolique	0,05
25 Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g

**Exemple 5 : Inhibition de la 5 $\alpha$ -réductase - dosage enzymatique - in vitro**

Principe et réalisation du test (adaptation selon Zy et Zu - 1998) :

La testostérone est métabolisée de façon irréversible par la 5 $\alpha$ -réductase en 5-déhydrotestostérone (5-DHT) en présence de son cofacteur NADPH. La réaction est suivie, à 37 °C, par la mesure, au moyen d'un spectrophotomètre, de la baisse de densité optique du milieu réactionnel à 340 nm, à la suite de la consommation de NADPH en NADP.

Le test consiste donc à mettre en présence de la testostérone, du NADPH et le produit à tester ou de son solvant seul (pour réaliser la réaction témoin).

Après 3 minutes d'attente pour équilibrer le système, la densité optique d'origine du système est mesurée puis, la réaction est déclenché par l'ajout de l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase. Au bout de 10 minutes, une seconde mesure de la densité optique finale est réalisée. La différence entre les deux mesures correspond à la quantité de NADPH consommée, quantité proportionnelle à la quantité de testostérone transformée en 5-DHT.

L'acide oléanolique et l'acide nordihydroguaiarétique ont été testés à différentes concentrations, seuls ou en association.

Résultats: le tableau suivant montre les pourcentages d'inhibitions (moyenne  $\pm$  SEM) observés au cours de cinq essais indépendants.

	Produit testé	[c]	% d'inhibition
		0,01 %	16,7 % $\pm$ 1,1
20	Acide oléanolique	0,03 %	31,7 % $\pm$ 2,9
		0,1 %	56,3 % $\pm$ 2,6
		0,01	2,1 % $\pm$ 1,6
	NDGA	0,04 %	3,7 % $\pm$ 2,6
		0,1 %	3,0 % $\pm$ 1,9
25	Acide oléanolique	0,03 %	
	+ acide nordihydroguaiarétique	0,04 %	68,3 % $\pm$ 3,1

➤ Ces résultats démontrent clairement que l'acide oléanolique présente une forte activité inhibitrice de la l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase puisqu'on observe dans nos

conditions une inhibition de 56% à seulement 0,1%. De plus, cet effet est spécifique puisqu'il est dépendant de la concentration.

- L'acide nordihydroguaiarétique utilisé seul ne présente aucune activité sur ce test.
- 5 ➤ Il y a une forte synergie entre les effets lorsque les deux produits sont utilisés en association puisque l'inhibition observée (68 %) est largement supérieure à la somme des effets individuels observés sur le même test aux mêmes concentrations puisque la somme des effets atteint seulement 35.4 %.

#### 10 Exemple 6 : *Inhibition de la 5 $\alpha$ -réductase - détermination HPLC - in vitro*

Principe et réalisation du test: le but de cet essai était de confirmer le résultat précédent mais au moyen d'un moyen analytique HPLC. En effet, contrairement à la 5-DHT, la testostérone absorbe la lumière à la longueur d'onde utilisée (245 nm). La diminution de la surface du pic de testostérone (qui se caractérise dans nos conditions opératoires  
15 avec un temps de rétention de 26 minutes) traduit la baisse de cette molécule dans le milieu étudié, et donc reflète l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

Le même type de protocole que dans l'exemple précédent est utilisé mais au lieu de lire les différentes densités optiques, les milieux réactionnels sont analysés par HPLC.

Résultats : le tableau suivant montre les pourcentages d'inhibitions (moyenne  $\pm$   
20 SEM) observés au cours de cinq essais indépendants.

	Produit testé	[c]	% d'inhibition
		0,01 %	10,9 % $\pm$ 1,4
	Acide oléanolique (obtenu à partir de feuille d'olivier)	0,03 %	25,6 % $\pm$ 2,0
25		0,1 %	47,7 % $\pm$ 3,8
		0,01	1,2 % $\pm$ 0,4
	acide nordihydroguaiarétique	0,04 %	1,0 % $\pm$ 0,9
	(obtenu à partir de <i>L. divaricata</i> )	0,1 %	0,9 % $\pm$ 0,7
	Acide oléanolique	0,03 %	
30	+Acide nordihydroguaiarétique	0,04 %	61,8 % $\pm$ 4,2

Ces résultats démontrent clairement que :

- Les effets observés dans cet exemple sont fortement superposables à ceux obtenus dans l'exemple précédent, ce qui confirme l'hypothèse de départ,
- L'acide oléanolique présente une forte activité inhibitrice de la l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase puisqu'on observe dans nos conditions une inhibition de 48% à seulement 0,1%. L'acide nordihydroguaiarétique utilisé seul ne présente aucune activité sur ce test.
- Il y a une synergie évidente entre les effets lorsque les deux produits sont utilisés en association puisque l'inhibition observée (61,8%) est largement supérieure à la somme des effets individuels observés sur le même test aux mêmes concentrations puisque la somme des effets atteint seulement 26,6 %.

**Exemple 7 : Effet anti-inflammatoire - in vitro**

Principe et réalisation du test: il est possible d'estimer un niveau d'inflammation par la détermination de la quantité de médiateurs tels que prostaglandines, leucotriènes ou interleukines.

Dans cet exemple, nous avons choisi le dosage de l'interleukine 6 (IL-6) sur des fibroblastes (FH) et sur des kératinocytes (KH) humains normaux en culture, après irradiations par les UV-B.

Schématiquement, les cellules sont mise en culture, dans un milieu de culture classique DMEMc + 10% SVF pendant des périodes de 24 heures pour le FH et d'une semaine pour les KH. Après élimination du tampon et deux rinçages successifs par une solution tampon phosphate, les cellules sont irradiées avec des UV-B sous un niveau d'énergie standardisé à 50 mJ.cm<sup>-2</sup>.

Le tampon est alors rapidement éliminé et remplacé par un milieu de culture identique à celui utilisé en début d'expérience mais contenant les extraits à tester aux concentrations pré-requises ou du DMSO pour la série contrôle. Après 24 heures, le milieu de culture est récolté et la détermination de sa concentration en IL-6 est réalisé au moyen d'une méthode Elisa standard.

Une série supplémentaire est réalisée selon le même protocole si ce n'est l'absence d'irradiation UV-B, afin de déterminer le taux de base et de contrôler la stabilité du système étudié. Enfin, les essais sont réalisés en triplicate.

Le tableau suivant montre les résultats (moyenne  $\pm$  SEM des pourcentages de variations par rapport aux tests réalisés sans exposition aux UV) obtenus au cours de 5 essais indépendants.

	Produit testé	[c]	FH	KH
			% de variation	% de variation
10	Aucun	-	+ 439 % $\pm$ 11	+ 450 % $\pm$ 15
		0,01 %	+ 455 % $\pm$ 14	+ 461 % $\pm$ 16
	Acide oléanolique	0,03 %	+ 437 % $\pm$ 12	+ 444 % $\pm$ 14
		0,1 %	+ 441 % $\pm$ 18	+ 450 % $\pm$ 14
		0,01	+ 356 % $\pm$ 18	+ 388 % $\pm$ 10
15	NDGA	0,04 %	+ 155 % $\pm$ 9	+ 201 % $\pm$ 10
		0,1 %	+ 87 % $\pm$ 7	+ 91 % $\pm$ 14
	Acide oléanolique	0,03 %		
	+acide nordihydroguaiarétique	0,04 %	+ 47 % $\pm$ 4	+ 58 % $\pm$ 4

Ces résultats démontrent clairement que:

- L'acide nordihydroguaiarétique présente un remarquable effet anti-inflammatoire sur les deux lignées cellulaires étudiées puisqu'on observe dans nos conditions (FH et KH) une inhibition de respectivement 19 % (+ 356% vs + 439%) et de 14% (+ 388% vs + 450%) à seulement 0,01%. De plus, cet effet est spécifique puisqu'il est dépendant de la concentration.
- L'acide oléanolique utilisé seul ne présente aucune activité sur ce test.
- Sur les deux lignées cellulaires, il y a une synergie évidente entre les effets lorsque les deux produits sont utilisés en association puisque l'on observe respectivement une inhibition de 90 % (+ 47 % vs + 439% sur les FH) et de 87 % (+ 58% vs +450 % sur les KH), ce qui largement supérieur à la somme des effets individuels observés sur le même test aux mêmes concentrations.

**Exemple 8 : Effet antiproliférateur sur kératinocytes - in vitro**

Principe et réalisation du test: comme la quantité d'ADN est fixe d'une cellule à l'autre, la mesure de la quantité globale d'ADN correspond à mesurer le nombre de cellules utilisées pour cette mesure. Ce principe permet de ne pas utiliser en routine des méthodologies plus fines mais très lourdes. Différentes techniques ont été développées sur la base de ce protocole dont notamment celle utilisée ici: en se liant à l'ADN, selon une stoechiométrie constante et connu, le fluorophore Hoechst 33258 présente d'une part une fluorescence augmentée mais également un décalage de son spectre d'émission de 492 nm à 458 nm. Par comparaison à des gammes de calibration préalablement établies, le suivi combiné de ces deux paramètres permet de quantifier la quantité d'ADN présente dans les échantillons cellulaires étudiés.

Schématiquement, les kératinocytes (KH) humains normaux sont mis en culture, dans un milieu de culture classique DMEMc + 10% SVF pendant une semaine. , en l'absence de produit à tester (série témoin afin de déterminer la prolifération cellulaire de base dans le système étudié) ou en présence des produits à tester, seuls ou en association. Le fluorophore Hoechst 33258 est ajouté en fin de manipulation, avant le prélèvement des aliquotes de cellules pour le dosage.

Les essais sont réalisés en triplicate au cours de trois essais indépendants entre eux.

Résultats: le tableau suivant montre les pourcentages d'inhibition (moyenne  $\pm$  SEM) sur les quantités d'ADN (et donc sur nombre le cellules présentes observées au cours de cinq essais indépendants).

Produit testé	[c]	% d'inhibition
Acide oléanolique	0,01 %	0,9 % $\pm$ 1,0
	0,03 %	1,1 % $\pm$ 1,6
	0,1 %	0,7 % $\pm$ 0,7
NDGA	0,01	10,2 % $\pm$ 1,5
	0,04 %	22,3 % $\pm$ 1,9
	0,1 %	29,9 % $\pm$ 1,7
Acide oléanolique	0,03 %	

+acide nordihydroguaiarétique 0,04 % 41,7 %  $\pm$  3,4

-----  
Ces résultats démontrent clairement que:

- L'acide nordihydroguaiarétique inhibe fortement la prolifération des kératinocytes puisqu'on observe dans nos conditions une inhibition de 10 % à seulement 0,01 %. De plus, cet effet est spécifique puisqu'il est dépendant de la concentration.
- L'acide oléanolique utilisé seul ne présente aucune activité sur ce test.
- Il y a une synergie évidente entre les effets lorsque les deux produits sont utilisés en association puisque l'inhibition observée (41,7 %) est largement supérieure à la somme des effets individuels observés sur le même test aux mêmes concentrations puisque la somme des effets atteint seulement 23,4 %.

Exemple 9 : *Effet anti-bactérien contre le Corynébactérium acnes - in vitro*

Principe et réalisation du test : On incorpore dans une gélose (Biomérieux) en surfusion, coulée dans une boîte de Pétri, 1 ml du prémix de l'exemple n° 1 ou de ces composants à tester à la concentration équivalente à 5% du prémix. La boîte est agitée pour bien homogénéiser le produit dans la gélose. On dépose 10 $\mu$ l d'une suspension de bactéries à étudier diluée respectivement pour contenir environ 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> bactéries/ml sur la gélose gélifiée, à température ambiante. Ensuite les boîtes sont incubées pendant 24 et 48 heures à 37°C et observées visuellement.

Les cinq souches *Corynebactérium minutissimum*, *Propionebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis* et *Acinetobactérium calcoaceticus* ont été étudiées.

Résultats : Le tableau suivant indique les activités antimicrobiennes constatées pour les constituants et leur association dans l'excipient cosmétique.

On observe une activité antimicrobienne sélective de l'acide oléanolique contre les germes *P. acnes* et *A. calcoaceticus*, une de l'acide nordihydroguaiarétique contre *A. calcoaceticus* et *S. hominis*, une de l'OSMOCIDE® contre *S. aureus*, *S. hominis* et *P. acnès* alors qu'aucun des autres composants ne montre d'effet.

La combinaison des constituants dans le prémix de l'exemple 1 montre l'activité antimicrobienne la plus complète, inactivant la totalité des germes testés.

Les souches étudiées sont représentées dans ce tableau comme:

- Souche A  $\Leftrightarrow$  *Coryne.Minutissimum*
- 5 Souche B  $\Leftrightarrow$  *Staph. hominis*
- Souche C  $\Leftrightarrow$  *Staph. aureus*
- Souche D  $\Leftrightarrow$  *P. Acnes*
- Souche E  $\Leftrightarrow$  *Acinetob.calcoaceticus*

Souches étudiées		A		B		C		D		E	
10	Bacteries/ml	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
	Butylène Glycol+ ac. oleanolique	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	BG+ ac.nordihydroguaiaietique	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	BG+ eau	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OSMOCIDE	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
15	PEG-60 Almond oil + eau	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Prémix n° 1 à 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Trichlosan (subst. de référence)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les résultats à 24 H (ci-haut) sont identiques à ceux observés à 48 H.

Lire: croissance bactérienne pour "+", absence de croissance bactérienne pour "-"

20

Exemple 10 : Effet anti-acné - in vivo

L'étude a porté sur 30 volontaires, également répartis entre les deux sexes, âgés de 14 à 20 ans, sélectionnés pour leur peau à tendance acnéique, c'est à dire présentant au moins 5 éléments inflammatoires (papules, pustules, nodules) et/ou

25

10 lésions rétentionnelles (comédon et microkystes).

Le produit testé, gel de l'exemple N°2, a été appliqué pendant 2 mois, matin et soir, après un nettoyage classique du visage. Tout autre produit (médicament topique, cosmétique ou dermatologique) a été proscrit pendant la période du test.

Le comptage et l'observation des lésions ont été réalisés par dermatologue, sur la

30 même surface cutanée du visage préalablement déterminée (20 cm²), avant le

traitement (T0), et après 30 (T30) et 60 (T60) jours de traitement. Une diminution significative des lésions et une amélioration nette de l'état du visage ont pu être constatées après ce traitement cosmétique, sans que le produit provoque irritation, œdème ou autre problème d'intolérance.

5 L'acide oléanolique associé ou non à l'acide nordihydroguaiarétique et/ou les extraits végétaux les contenant sont donc avantageusement utilisés dans la prévention et le traitement des peaux à tendance acnéique, puisque:

- L'acide oléanolique diminue l'hyperséborrhée par inhibition de la 5 $\alpha$ -réductase, et
- 10 ➤ l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) produit un effet anti-inflammatoire et anti-prolifération des kératinocytes et réduction de la hyperkératinisation.

Dans les compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques, il peut être avantageux d'associer les extraits cités avec d'autres actifs afin de renforcer leur effet par additivité ou synergie entre les effets de ces différents produits, ou afin  
15 d'associer l'effet décrit dans cette demande de brevet avec un autre effet physiologique bénéfique au niveau cutané, des muqueuses, des phanères (cheveux et cuir chevelu), comme par exemple l'OSMOCIDE<sup>®</sup> (Sederma).

Les concentrations d'acide oléanolique et éventuellement de l'acide nordihydroguaiarétique dans le produit cosmétique ou dermatopharmaceutique  
20 peuvent varier entre 1 et 10000 ppm (0,0001 et 1% p/p), préférentiellement entre 10 et 1000 ppm (0,001 et 0,1% p/p). En association avec l'acide nordihydroguaiarétique, on emploie préférentiellement 5 à 50 ppm (0,0005 à 0,05 % p/p d'acide oléanolique et 1 à 100 ppm (0,0001 à 0,01 % p/p) d'acide nordihydroguaiarétique. Les concentrations des extraits plus ou moins bruts ou  
25 purifiées des feuilles d'olivier et de *L. divaricata* à utiliser dans les produits finis sont fonction des teneurs en acide oléanolique et acide nordihydroguaiarétique respectivement ; les concentrations finales des molécules principalement actives (acide oléanolique et acide nordihydroguaiarétique) doivent être comprises dans les fourchettes citées.

L'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs, peut être utilisé dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles, sans que cette liste soit limitative.

L'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs, peut être utilisé sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulé dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

L'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) peut être combiné avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, tout principe actif hydro- ou liposoluble, extraits végétaux de toute sorte, peptides synthétiques, protéines, vitamines, extraits tissulaires, extraits marins, filtres solaires, antioxydants.

L'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs, peut être utilisée dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques pour tous les soins de la peau, à visée hydratante, anti-inflammatoire et dans la prévention et le traitement des peaux à tendance acnéique.

L'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous

forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs, peut être incorporée dans des compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques pour la préparation d'un médicament utilisé pour tous les soins de la peau à visée hydratante, anti-inflammatoire et dans la prévention et le traitement des peaux à tendance acnéique.

L'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs, peut être utilisé pour l'imprégnation de toute sorte de textiles, fibres synthétiques ou naturelles, laines et tout matériaux susceptibles d'être utilisé pour réaliser des vêtements ou sous-vêtements, tissus actifs de toute sorte, lingettes, patchs, compresses, cotons, et coton-tiges, pansements, éponges démaquillantes, masques, et tout support susceptible d'être directement au contact de la peau et du cuir chevelu, pour en permettre une délivrance topique continue.

## REVENDEICATIONS

1. Utilisation de l'acide oléanique pur ou contenu dans un extrait titré de feuilles d'*Olea europaea* en quantité efficace et suffisante dans une composition cosmétique ou dermopharmaceutique destinée à prévenir et traiter les symptômes de l'acné, de l'hyperséborrhée et des peaux à tendance acnéique.
2. Utilisation de l'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*) selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est accompagnée de l'utilisation d'une quantité efficace et suffisante de l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata*).
3. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques destinées à prévenir et traiter les symptômes de l'acné, de l'hyperséborrhée et des peaux à tendance acnéique contenant une quantité efficace et suffisante d'acide oléanolique ou d'un extrait titré de feuilles d'*Olea europaea* le contenant.
4. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon la revendication 3 caractérisées en ce qu'elles renferment également une quantité efficace et suffisante d'acide nordihydroguaiarétique ou d'un extrait titré de *Larrea divaricata* le contenant.
5. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4 caractérisées en ce que la quantité d'acide oléanolique est comprise entre 1 et 10000 ppm (0,0001 et 1 % p/p), préférentiellement entre 10 et 1000 ppm (0,001 et 0,1 % p/p).
6. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 5 caractérisées en ce que la quantité d'acide nordihydroguaiarétique est comprise entre 1 et 10000 ppm (0,0001 et 1 % p/p), préférentiellement entre 10 et 1000 ppm (0,001 et 0,1 % p/p).
7. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 6 caractérisées en ce que la concentration de l'acide oléanolique (utilisé pur ou sous forme d'un extrait d'*Olea europaea*) est comprise entre 5 à 50 ppm (0,0005 à 0,05 % p/p) et la concentration d'acide

nordihydroguaiarétique (utilisé pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata*) est comprise entre 1 à 100 ppm (0,0001 à 0,01 % p/p).

8. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 7 caractérisées en ce que l'acide oléanolique pur ou sous  
5 forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata*) est combiné avec tout autre ingrédient habituellement utilisé dans le domaine cosmétique et dermatopharmaceutique : lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et  
10 émulsifiants, tout principe actif hydro- ou liposoluble, extraits végétaux de toute sorte, peptides synthétiques, protéines, vitamines, extraits tissulaires, extraits marins, filtres solaires, antioxydants.
9. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 8 caractérisées en ce que l'acide oléanolique pur ou sous  
15 forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata*) est combiné avec OSMOCIDE<sup>®</sup> (commercialisé par la Société Sederma, France).
10. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 9 caractérisées en ce que l'acide oléanolique pur ou sous  
20 forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata*) ou combiné avec d'autres actifs, est utilisé dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermatopharmacie: gels, émulsions  
25 H/E et E/H, laits, lotions, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.
11. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 10 caractérisées en ce que l'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en  
30 association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait

titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs est utilisé sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulé dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

12. Utilisation de l'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs pour la préparation d'un médicament utilisé pour tous les soins de la peau à visée hydratante, anti-inflammatoire et dans la prévention et le traitement des peaux à tendance acnéique.

13. Compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 13 caractérisées en ce que l'acide oléanolique pur ou sous forme d'extrait titré de feuille d'olivier (*Olea europaea*), seul ou en association avec l'acide nordihydroguaiarétique (pur ou sous forme d'un extrait titré de *Larrea divaricata* ) ou combiné avec d'autres actifs, peut être utilisé pour l'imprégnation de toute sorte de textiles, fibres synthétiques ou naturelles, laines et tout matériaux susceptibles d'être utilisés pour réaliser des vêtements ou sous-vêtements, tissus actifs de toute sorte, lingettes, patchs, compresses, cotons, et coton-tiges, pansements, éponges démaquillantes, masques, et tout support susceptible d'être directement au contact de la peau et du cuir chevelu, pour en permettre une délivrance topique continue.